

# Constituição da alexina e mecanismo da hemolyse específica

pelos

**DRS. J. DA COSTA CRUZ e H. DE AZEVEDO PENNA**

---

Em 1888, em memoravel trabalho, submettendo a theoria da phagocytose à minuciosa analyse, Nuttall descobriu o poder bactericida do sangue. Verificou logo que, com excepção do cammondongo, todos os animaes de sangue quente examinados, homem, cão, carneiro, coelho, etc., apresentavam essa propriedade com grande constancia em face de varias especies microbianas e que se o sangue provinha de animaes que tinham sido préviamente submettidos á immunização essa propriedade era ainda mais exaggerada. Segundo Nuttall a phagocytose só intervinha quando as bacterias se achavam mortas ou sufficientemente attenuadas pela acção das propriedades bactericidas do liquido sanguineo, estabelecendo assim os fundamentos do estudo que só 20 annos mais tarde Wright havia de realisar sobre opsoninas. Nuttall verificou tambem logo que a propriedade bactericida se gastava durante a acção bactericida e que era por isso em parte proporcional á quantidade de bacterias postas em presença do sangue. Por outro lado estabeleceu que essa propriedade era muito instavel e desaparecia rapidamente pela conservação á temperatura ambiente ou pelo aquecimento a 55°C. durante meia hora, o que levou a crêr que fosse devido á acção de um fermento.

No anno seguinte Buchner confirmou todos os resultados de Nuttall e em 1890, submettendo os sôros á dialyse, poude affirmar que a propriedade bactericida era attributo de uma substancia albuminoide que para exercer a sua actividade exigia um estado physico especial, isto é, um arranjo particular das molleculas de albumina dentro dos grupos maiores das micelas. A' essa substancia deu Buchner, em 1891, o nome de alexina. O estudo da alexina fez poucos progressos até 1894, quando em consequencia da descoberta do phenomeno de Pfeiffer tomou novo incremento. Na intensa investigação que então em torno delle se fez são de relevancia os trabalhos de Bordet. Esse autor demonstrou de maneira mais cabal que a acção bactericida era o resultado da actividade simultanea de duas substancias differentes, uma especifica, relativamente termo-resistente que

denominou *sensibilizadora* e outra, não especifica, que pelas suas propriedades termolabeis correspondia á alexina de Buchner. Ao mesmo tempo Bordet verificou que a propriedade lytica da alexina não se limitava a agir sobre os sêres com vida autonoma, mas se podia estender a elementos cellulares de organismos superiores como globulos vermelhos e, demonstrando que a hemolyse produzida pelos sôros obedecia ás mesmas leis que regiam a bacteriolyse, tornou, graças á simplificação da technica, possível de ser levada a analyse do problema a um grao que estava longe de ter podido attingir. Com essa analyse origina-se uma controversia entre Bordet e Ehrlich com seus collaboradores, da qual resulta a verificação assaz curiosa de que a substancia termo-resistente e especifica dos sôros póde adherir ás bacterias ou ás hematias na ausencia da alexina e que sem essa adhesão a alexina não exerce nenhuma acção hemolytica ou bacteriolytica. Durante alguns annos os trabalhos que versaram sobre este assumpto não alteraram as noções até ahí adquiridas sobre a constituição da alexina.

Em 1907, inesperadamente, Ferrata, retomando o estudo acima citado de Buchner a proposito da acção da dialyse sobre a alexina, verificou que essa substancia não é simples, mas constituida de facto por dois elementos, um dos quaes precipita em agua distillada ao passo que o outro permanece soluvel. Isoladamente qualquer delles é incapaz de determinar a hemolyse de globulos sensibilizados o que sem embargo rapidamente fazem se forem addicionados simultaneamente a globulos e sensibilizadora. Estes interessantes resultados foram logo confirmados por numerosos autores, melhorados os processos de separação desses dois elementos e Brand ainda no mesmo anno não só mostra que ambos são termolabeis como a propria alexina, mas tambem que a parte precipitada pela agua distillada, a parte globulina, redissolvida em agua physiologica adhire directamente aos globulos sensibilizados (Mittelstück) e sem essa adhesão a fracção soluvel em agua distillada (Endstück) não póde exercer nenhuma actividade, comportando-se, portanto, esta ultima, em relação á primeira, como a alexina em relação á sensibilizadora.

Michaelis e Skwirsky verificam que se a concentração dos ions H é de (H')  $3,8.10^{-6}$  a fracção globulina adhire aos globulos sensibilizados e póde então ser aquecida a  $56^{\circ}$  sem perder a sua actividade, mas a fracção albumina permanece livre no liquido e não ha, por consequencia, hemolyse. Aos globulos assim carregados de sensibilizadora e Mittelstück, denominou Michaelis, globulos persensibilizados. Logo a seguir Skwirsky assignala que na maior parte das reacções de Bordet e Gengou (Reacção de Wassermann, sôro tuberculoso e tuberculina, sôro precipitante e precipitogenio homologo) a parte da alexina correspondente á fracção albumina

permanece livre no liquido e que a ausencia da hemolyse do systema hemolytico é devida á falta exclusiva da fracção globulina. A necessidade da colaboração de duas substancias para que se revelasse a propriedade alexica estava assim bem estabelecida pelas mais variadas technicas e o estudo das propriedades da alexina levou, de então em diante, em conta a complexidade d'esse agente.

Retomando, em 1912, o estudo da acção inactivante do veneno de cobra sobre a alexina, Ritz é levado a admittir que além das duas fracções descobertas por Ferrata mais uma e esta relativamente termoresistente é indispensavel para que se exerça a actividade alexica. Com effeito nos sôros assim inactivados a regeneração da alexina se faz facilmente pela simples introducção de sôro de cobaya inactivado pelo calor, d'onde se tem forçosamente que concluir que os componentes de Ferrata lá existem na quantidade necessaria. Liefmann, opondo-se a esta maneira de ver, achou antes razoavel, dada a complexidade do veneno de cobra, que a sua mistura com sôro fresco poderia alterar de tal fórma o meio ambiente que o tornasse improprio para o processo de hemolyse. A addicção de sôro inactivado teria como resultado recompôr, em parte ou no todo, as condições primitivas. Já Noguchi e Brofenbrenner tinham encarado por egual modo a dissociação das fracções termolabeis de Ferrata. Acreditavam esses autores que a actividade alexica era exclusivamente obra da fracção albumina, e que a fracção globulina pelo seu character anfotero apenas concedia ao meio as condições de reacção indispensaveis para se poder realizar o processo. Em 1914, porém, Coca demonstrou que cabia a Ritz razão quando affirmava a existencia de um componente termoresistente da alexina. Estudando a acção antialexica exercida por emulsões de levedos e órgãos, que tinha sido observada por V. Dungern, já em 1901, chegou de facto á verificação de que os sôros por esses meios inactivados eram como os inactivados pelo veneno de cobra, capazes de readquirir a sua primitiva actividade pela addicção de sôro inactivado pelo calor. Com este novo methodo de exame a objecção de Liefmann desaparece, pois é difficil encontrar outra interpretação para explicar a influencia das emulsões de levedo que não seja baseada n'um processo de adsorpção. Ainda nesse anno, Ritz e Sachs observam que esse terceiro componente póde ser, tambem, retirado dos sôros frescos por emulsões bacterianas sobretudo de *B. prodigiosus*. Omorokow, Sachs e Omorokow, accentuam a importancia da concentração para a inactivação pelo veneno de cobra e pelas emulsões bacterianas. N'esse mesmo anno ainda Nathan confirma os resultados do anno anterior de Weil, segundo os quaes os globulos sensibilizados postos em contacto com sôro de cobaya inactivado pelo veneno de cobra ou por emulsões bacterianas se carregam tanto com a fracção

globulina como com a fracção albumina de Ferrata e denomina os globulos n'essas condições de hypersensibilizados.

Ritz e Sachs, em 1917, estudando o mecanismo da inactivação da alexina pelas emulsões bacterianas approximam-o do da formação da anaphylatoxina *in vitro*. Nessa mesma occasião Nathan, assignala que tanto o veneno de cobra quanto as emulsões bacterianas são incapazes de retirar ao sôro inactivado pelo calor o terceiro componente que n'elle se encontra activo. Em 1930, Cruz e Penna, não só confirmam esse ultimo resultado de Nathan, mas assignalam que o formaldehydo em condições determinadas retira o terceiro componente, tanto aos sôros frescos como aos que foram préviamente inactivados pelo aquecimento meia hora a 55°.

Bem estabelecida assim a existencia do terceiro componente, não parou ahi a complexidade da alexina, pois que em 1926, Gordon Whitehead e Wormal ao estudar a acção dos fermentos proteolyticos sobre a alexina têm a oportunidade de verificar que ella póde ser inactivada por pequenas quantidades de ammonia e que essa inactivação corre por conta, não da destruição do terceiro componente nem das fracções termolabeis de Ferrata, mas de uma outra termoresistente que denominaram *quarto componente*.

Deve-se portanto admittir actualmente que a alexina é com effeito constituida por quatro elementos: um termolabil que apresenta todas as propriedades physico-chimicas das globulinas; outro tambem termolabil apresentando as propriedades das albuminas (pseudo globulinas), outros dois termoresistentes, o chamado terceiro componente que se retira dos sôros frescos pela acção do formol ou do veneno de cobra, emulsões bacterianas, de orgãos ou de levedos em geral acções de adsorpção, e finalmente um quarto componente tambem termoresistente que desaparece dos sôros frescos ou inactivados quando se lhes adicionam pequenas quantidades de ammonia.

#### *Constituintes termoresistentes.*

Quando se estudam os factores que exercem qualquer acção nociva sobre a propriedade alexica a grande difficuldade, certamente a maior, está em saber se essa acção se faz sentir directamente sobre a alexina ou sobre o meio extremamente complexo em que ella exerce a sua actividade. Em alguns casos se verifica que esta ultima hypothese é facilmente demonstravel, assim além de certos limites de pH, tanto para a zona alcalina como para a zona acida, a hemolyse especifica é inhibida, mas essa inhibição cessa se a reacção é de novo ajustada a um pH nas visinhanças da

neutralidade. Nas soluções hypertonicas dos saes neutros, como o proprio chloreto de sodio, a hemolyse tambem não se dá mas basta reduzir no liquido o teôr do sal ou por diluição em agua distillada ou por dialyse para ver reaparecer a actividade alexica se se attinge de novo a isotonia. Em outros casos porém a duvida é mais difficil de esclarecer. E' o que acontece, por exemplo, com a simples inactivação pelo calor.

Com effeito se se aquece sôro fresco de cobaya por espaço de meia hora em banho maria a 54° (temperatura rigorosamente controlada), verifica-se que na dóse de 0,5 c.c. posto em presença de globulos sensibilizados por 40 unidades hemolyticas por espaço de meia hora a 37°, não dá traços de hemolyse. Se todavia, se lhe addiciona quer a fracção globulina quer a fracção albumina de Ferrata, na dóse de 0,1, (separação perfeita, não dando traços de hemolyse na dóse de 0,2 c.c. qualquer d'ellas separadamente) o sôro aquecido a 54° dá hemolyse total rapida com 0,1 c.c. E' pois evidente que a inactivação da alexina nessa temperatura não corre exclusivamente por conta duma destruição de qualquer desses dois elementos. Ainda facto mais curioso é que se se abandona um tal sôro por espaço de 18 a 20 horas á temperatura de 5° a 6°, elle readquire parcialmente a sua actividade hemolytica, dando hemolyse total com a mesma emulsão de globulos, como acima fortemente sensibilizados, mesmo na dóse de 0,2 c.c. em meia hora de banho maria a 37°. Por outro lado o sôro fresco conservado na mesma temperatura de 6° durante o mesmo periodo de tempo não apresenta augmento nenhum do titulo alexico, como rigorosamente verificamos, parece pois evidente que a inactivação corre por conta ou da destruição de uma outra fracção termolabil até agora não assignalada ou de uma alteração do meio até certo ponto reversivel e esta ultima hypthese não é a menos plausivel. Em vista disso podia-se perguntar se a inactivação a 55° ou 56° não altera o meio da mesma fórma mas apenas com maior intensidade e de modo irreversivel. Todos os autores entretanto acreditam que não, pois que o sôro assim inactivado não apresenta a maior parte das vezes acção anticomplementar apreciavel e por outro lado, não produz hemolyse pela addição das fracções labelis separadamente. Pensamos que a questão de saber se a inactivação dos sôros corre por conta de uma modificação do meio, ou da destruição de um dos constituintes da alexina, é difficil de resolver mas não impossivel, pelo menos em alguns casos, como adeante veremos.

Devemos tambem preoccupar-nos em estabelecer claramente o que se entende por alexina. Essa substancia póde revelar-se nos sôros frescos por propriedades lyticas, (bactericidas) por propriedades opsonizantes e por propriedades conglutinantes. Todavia tanto as propriedades opsoni-

zantes (Gordon, Whitehead, Wormall) como as propriedades conglutinantes (Bordet) podem existir em sôros incapazes já de produzir a hemolyse por falta de uma das fracções da alexina. Quando aqui falamos de alexina queremos exprimir com essa palavra a capacidade integral dos sôros frescos de produzirem a hemolyse em presença de globulos sensibilizados.

A technica que empregamos nestas pesquisas já foi descrita em trabalho anterior e nada temos a acrescentar-lhe. As reacções de hemolyse foram sempre feitas em 4 c.c. de liquido. Usamos sempre em cada tubo 1 c.c. da solução a 2,5 % de globulos de carneiro lavados, misturados a 1 c.c. de sôro hemolytico de coelho anti-carneiro contendo 40 unidades hemolytantes, que correspondia a uma diluição de  $1/210$  do sôro hemolytico inactivado de coelho. As fracções do complemento foram obtidas, as termolabeis pelo methodo de Liefmann ligeiramente modificado: diluição ao decimo do sôro fresco de cobaya em agua distillada gelada, passagem de gaz carbonico por espaço de 13 minutos, centrifugação e lavagem do deposito em agua distillada gelada e saturada de gaz carbonico. Reconstituição da isotonia e do pH. As fracções termo-resistentes eram obtidas: o terceiro componente por adsorpção com emulsões de levedos (Fleischman's Yeasts), que permaneciam em contacto com sôro fresco a  $37^{\circ}$  por espaço de 2 horas; a fracção correspondendo ao quarto componente era obtida segundo a technica de Gordon, Whitehead e Wormall, adicionando a cada 2 c.c. de sôro fresco 0,5 de uma solução de ammonia a  $n/6,5$ , deixando em contacto a  $37^{\circ}$  em banho maria por espaço de hora e meia e finalmente neutralizando com acido chlorhydrico  $n/5$  de modo a reconstituir o pH anterior, isto é, addicionando cerca de 0,37 c. c. Para retirar o terceiro componente pelo formol, addicionavamos a cada 2 c.c. de sôro fresco de cobaya 0,2 c.c. de uma solução a  $1/100$  de formol do commercio e deixava-se a mistura por espaço de uma hora em banho maria a  $37^{\circ}$ .

*Mecanismo da acção do formol sobre a alexina de cobaya.* — No nosso trabalho anterior já accentuámos que só excepcionalmente os sôros inactivados pelo formol podem reactivar o sôro inactivado pelas emulsões de levedo. As numerosas experiencias que até esta data fizemos levam-nos a identificar de modo seguro o componente inactivado pelo formol ao terceiro componente de Ritz e Coca. O mecanismo segundo o qual essa inactivação é feita, podia attribuir-se a uma adsorpção do terceiro componente por productos do sôro alterados physicamente pelo formol pois é bem conhecida a acção gelificante d'essa substancia. Seria assim uma acção semelhante á que exercem as emulsões de levedos, de bacterias de órgãos, etc. De facto não é. Como já fizemos notar no trabalho anterior, existe

uma diferença fundamental entre o formol e esses colloides. Enquanto estes são impotentes para retirar ao sôro de cobaya inactivado pelo calor o terceiro componente o formol ao contrario retira tanto d'esse sôro como do sôro fresco o terceiro componente. A acção do formol talvez se possa attribuir a um processo de oxydo-reducção semelhante ao que se passa no leite fresco na reacção de Shardingier. Tal como n'esse caso o formol só age em meio neutro ou melhor ligeiramente alcalino como mostra a seguinte experiencia:

Em tres tubos de aglutinação collocaram-se 2 c.c. de sôro fresco de cobaya em cada um. Ao primeiro adicionou-se uma gotta de acido chlorhydrico n/1 ao segundo 1 gotta de agua physiologica, ao terceiro duas gottas de soda n/1, a cados em banho maria a 37° durante meia hora foram dosados no seu teôr alexico seguir a todos tres 0,2 c.c. da solução a 1/100 de formol do commercio. Collo sobre globulos fortemente sensibilizados.

Os resultados veem-se no quadro I em que a leitura da hemolyse foi feita após meia hora de banho maria a 37°C.

Vê-se claramente que a acção do formol é praticamente nulla em meio acido e muito intensa em meio alcalino.

Repetida a experiencia adicionando a cada tubo, 0,2 c.c. da solução a 1/10 de formol, obtivemos ao fim de 15 minutos de banho maria a 37° o resultado seguinte:

Sôro formol 1 % acido — actividade alexica 0,1—hemolyse total.

Sôro formol 1 % neutro—actividade alexica 0,5—ausencia de hemolyse.

Sôro formol 1 % alcalino—actividade alexica 0,5—ausencia de hemolyse.

Verificámos que no segundo e no terceiro tubo não só o terceiro mas os dois componentes termolabeis da alexina tinham sido destruidos.

E' opportuno notar que tal como acontece á inactivação do terceiro componente da alexina pelo formol, se se faz a reacção de Shardingier em leite fresco ou aquecido a 56° meia hora, os resultados da reducção do azul de methyleno pela addição de formol não differem, mas o mesmo não acontece quando se varia a reacção do meio ou a concentração do formol.

*Experiencia no. 1*—Em uma serie de pequenos tubos para aglutinação foram collocados 2 c.c. de leite fresco e adicionados ao 1° tubo 0,2 c.c. de formol a 1/10, ao segundo 0,2 c.c. de formol a 1/100, ao terceiro 0,2 c.c. de formol a 1/1000 e ao quarto 0,2 c.c. de formol a 1/10.000.

Uma serie identica foi feita com leite fresco aquecido meia hora a 56°. Adicionaram-se a todos os tubos tres gottas de azul de methyleno a 1 %.

QUADRO I

Sôro a 56°.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,2
Sôro formol 1/1000 acido.	0,2	0,1	0,06	0,02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sôro formol 1/1000 neutro.	—	—	—	—	0,2	0,1	0,06	0,02	—	—	—	0,03	—	—
Sôro formol 1/1000 alcalino	—	—	—	—	—	—	—	—	0,4	0,2	0,1	—	0,1	—
Agua physiologica.	1,8	1,9	1,94	1,98	1,8	1,90	1,94	1,98	1,66	1,8	1,9	1,87	1,8	1,2
Globulos Sensibilizados.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
<b>Resultados</b>	<b>h. t.</b>	<b>h. t.</b>	<b>h. t.</b>	<b>h. t.</b>	<b>h. t.</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>h. t.</b>	<b>h. t.</b>	<b>0</b>

H. t. == Hemolyse total.

0 = Ausencia de hemolyse.



Resultados ao fim de 10 minutos a 40°: Descoramento nos segundos tubos de cada serie. Nos outros não ha alteração. Ao fim de meia hora o aspecto é o mesmo com a diferença que nos primeiros tubos embora não haja descoramento se observa uma ligeira alteração da tonalidade do azul de methyleno.

*Experiencia nº. II*—Uma partida de leite fresco foi distribuida na dóse de 10 c.c. em tres tubos de ensaio. O primeiro tubo foi adicionado de 0,2 c.c. de acido chlorhydrico n/1, de modo a dar uma reacção francamente acida ao tornesol, ao terceiro adicionaram-se 0,2 c.c. de soda n/1, de fórma a obter uma reacção nitidamente alcalina ao tornesol, o segundo verificou-se que dava uma reacção neutra ao tornesol.

Essas tres amostras de leite fresco foram distribuidas cada uma em uma serie de tubos de hemolyse na dóse de 2 c.c., aos quaes a seguir se adicionaram 3 gottas de azul de methyleno a 1 % e 0,2 c.c. de formol do commercio em quantidades decrescentes, isto é: 1/10, 1/100, 1/1.000, e 1/10.000.

Collocados os tubos a 40° ao fim de 5 minutos observou-se descoramento completo do corante no tubo contendo formol a 1/1.000 na serie de leite alcalinizado. Ao fim de 20 minutos descoramento do tubo correspondente da serie de leite neutro. Ao fim de duas horas nenhum dos tubos da serie acida apresentava traços de descoramento.

Não deixa, portanto, de ser curioso que a acção do formol sobre o terceiro componente da alexina se exerça não só dentro das concentrações optimas para a reacção de Shardingier como dentro dos mesmos limites de reacção do meio. Estamos pois em crêr que, embora não se obtenha descoramento do azul de methyleno pela addição de formol ao sôro fresco, a acção d'esta substancia sobre o terceiro componente se deve exercer, como na reacção de Shardingier, por uma via indirecta.

Em face d'esses resultados pareceu-nos razoavel estudar o papel que outros reductores mais energicos por ventura exerceriam sobre a alexina.

#### *Acção do hydrosulphito de sodio sobre alexina de cobaya.*

Pesquizando n'esse sentido encontrámos no estudo da acção do hydrosulphito de sodio sobre sôro fresco de cobaya resultados interessantes. Depois de alguns ensaios verificámos que esse corpo exerce uma acção inactivante sobre o complemento, sem em nada alterar os componentes la-beis da alexina se é misturado no sôro de modo a formar nelle a solução a 1/100, conforme se vê da seguinte experiencia:

A 2 c.c. de sôro fresco de cobaya são adicionados 0,02 grs. de  $S^{2}O^{4}Na^{2}$  (Kahlbaum) crystalizado, que por ligeira agitação entra rapidamente em solução. Colloca-se o material em banho maria a 37° por espaço de 1/2 hora, finda a qual se neutraliza a mistura pela addição de duas gottas de soda normal. Colloca-se a

seguir o tubo com esse sôro immerso em agua gelada. O quadro II mostra não só que a inactivação do terceiro componente é perfeita mas que não houve mesmo ligeira diminuição do teôr do sôro nas fracções labels que se encontram na concentração inicial do sôro fresco.

Como se vê a addição de sôro inactivado pelo calôr restitue integralmente a actividade alexica ao sôro inactivado pelo hydrosulphito.

Além do sôro inactivado pelo calor, o sôro inactivado pelo hydro-sulphito pôde ser reactivado não só pelo sôro inactivado pela ammonia como pelo sôro inactivado pelo formol ou pela gelose. A reactivação pelo sôro inactivado pelo levedo ou não se dá ou se dá só de modo incompleto, o que as mais das vezes succede como mostra o quadro III.

E' portanto evidente que o hydrosulphito destróe um componente termo-resistente da alexina differente daquelle que destróe o formol. Ambos porém não são completados pelo sôro tratado pelo levedo o que significa que ambos devem estar comprehendidos naquillo que se chama terceiro componente. E' tambem curioso notar que os sôros de que se retira o terceiro componente pela gelose, como mostram os tubos n.ºs. 16 e 17, não completam o sôro tratado pelo formol mas completam bem o sôro inactivado pelo hydrosulphito. E' fóra de duvida pois que este chamado terceiro componente é constituído ao menos por duas substancias differentes, facto que aliás o estudo da adhesão dos componentes da alexina aos globulos sensibilizados, como veremos adeante, claramente confirma.

A acção inactivante do hydrosulphito exerce-se tanto no sôro fresco como no sôro inactivado pelo calôr. E' o que tambem se dá com a ammonia e o formol e o contrario do que se passa com a gelose e as emulsões de levedo.

Vêja-se o quadro IV.

QUADRO IV

TUBOS	1	2	3	4	5
Sôro S <sup>2</sup> O <sup>4</sup> Na <sup>2</sup> .	0,2	—	—	0,1	0,1
Sôro 56º.	—	0,2	—	0,1	—
Sôro 56º S <sup>2</sup> O <sup>4</sup> Na <sup>2</sup> .	—	—	0,2	—	0,1
Agua physiologica.	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Glob. sensibilizados.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados	0	0	0	h. t.	0

h. t. = Hemolyse total.

0 = Ausencia de hemolyse.

QUADRO II

Sôro fresco.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,04	0,02	0,01
Sôro S <sup>2</sup> O <sup>4</sup> Na <sup>2</sup> .	0,2	0,15	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0,2	0,15	0,1	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	—	—	—	
Sôro 56°.	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	—	—	
Agua physiologica.	1,8	1,85	1,9	1,92	1,94	1,96	1,98	1,99	1,7	1,75	0,8	0,82	0,84	0,86	0,88	0,89	1,8	1,96	1,98	1,99
Glob. sensibilizados.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados	0	0	0	0	0	0	0	0	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	traços	0	h. t.	h. t.	traços

0 = Ausencia de hemolyse.

H. t. = Hemolyse total.

QUADRO III

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Sôro NH <sub>3</sub> .	0,1	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sôro Levedo.	—	0,2	—	—	—	—	0,1	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—
Sôro Gelose.	—	—	0,1	—	—	—	—	0,05	—	—	—	0,05	—	—	—	0,05	0,05	0,05	—	—	—
Sôro Formol.	—	—	—	0,2	—	—	—	—	0,1	—	—	—	0,1	—	—	0,1	—	—	0,1	0,1	—
Sôro S <sup>2</sup> O <sup>4</sup> Na <sup>2</sup> .	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	0,1	—	—	—	0,1	—	—	0,1	—	0,1	—	0,1
Sôro 56°.	—	—	—	—	—	0,2	—	—	—	—	0,1	—	—	—	0,1	—	—	0,1	—	0,1	0,1
Agua physiologica	1,8	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	1,8	1,85	1,8	1,8	1,8	1,85	1,8	1,8	1,8	1,85	1,85	1,85	1,8	1,8	1,8
Glob. sensibilizados.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados com 1/2 h. 37°.	0	0	0	0	0	0	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	0	0	h. p.	h. t.	0	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.

H. t. = Hemolyse total.

H. p. = Hemolyse parcial.

0 = Ausencia de hemolyse.

As fracções labéis que permanecem activas nos sôros inactivados quer pela ammonia quer pelo formol ou pelo hydrosulphito pódem ser facilmente separadas em agua distillada pela precipitação pelo gaz carbonico. Verifica-se então que quer a fracção globulina quer a fracção albumina que se obtem, isoladamente ou cada uma de per si, adicionadas a sôro inactivado pelo calor são incapazes de produzir a hemolyse de globulos sensibilizados. Esta se dá todavia se se fazem agir as duas simultaneamente em presença de sôro inactivado pelo calôr.

---

O mecanismo de inactivação do sôro fresco pelo hydrosulphito é de suppôr se faça por meio de uma reduccão directa de certa substancia do sôro; o do formol já vimos que apresenta muitas analogias com o da reduccão do azul de methyleno no leite fresco na reacção de Shardingier; o das substancias adsorventes, levedos, gelose, etc. não parece facil apurar experimentalmente com sufficiente gráo de certeza.

Pelo facto que esses adsorventes não retiram o terceiro componente ao sôro inactivado pelo calor, poder-se-ia pensar que para essa inactivação são indispensaveis substancias termolabeis a que ella, essencialmente, fosse devida. Não deixaria de ser plausivel que essas substancias adsorvessem não directamente o terceiro componente, mas substancias anti-fermentativas cuja retirada do sôro trouxesse como consequencia a destruição do terceiro componente por fermentos activos. E' o que já fizemos sentir no trabalho anterior. A favor d'essa hypothese falaria não só o facto de que a acção d'essas substancias para se tornar effectiva necessita por vezes um tempo de contacto mais ou menos longo com o sôro, mas tambem a estreita relação que existe entre a formação de anaphylatoxina n'esses sôros e a inactivação do terceiro componente. Não devendo prevalecer essa hypothese, seria obrigadamente necessario admittir que o sôro inactivado pelo calor exerce uma acção inibidora sobre a acção inactivante d'esses adsorventes. No primeiro caso é evidente que essas substancias adicionadas a uma mistura de sôro fresco e sôro aquecido a 56° deveriam poder destruir o terceiro componente do sôro inactivado na mistura; na segunda hypothese seria de esperar o contrario. Fizemos pois a experiencia seguinte visando colher esses resultados:

Em um tubo de hemolyse collocou-se 1 c.c. de sôro fresco de cobaya e a seguir mais 1 c.c. do mesmo sôro inactivado pelo aquecimento em banho maria a 56° meia hora. Depois de ligeira agitação para bôa mistura adicionou-se uma quantidade de levedos lavados representando meia pastilha de Fleishmann's Yeasts. Após agitação energica afim de obter uma emulsão homogenea, collocou-se o tubo

em banho maria a 37° por espaço de 2 horas. Dois tubos testemunhos acompanharam a experiencia, um contendo 2 c.c. de sôro fresco e correspondente quantidade de levedo, e outro contendo 2 c.c. de sôro inactivado a 56° e igual quantidade da emulsão de levedos.

Após energica centrifugação, d'esses tres tubos os liquidos foram decantados e dosados no seu teôr em terceiro componente. (Vide quadro V).

Conforme se vê do quadro acima a emulsão de levedo empregada reduziu consideravelmente a actividade alexica do sôro fresco (tubos 2 a 4) sem alterar os componentes lábeis desse sôro (tubo 5). Essa mesma emulsão nem de leve attingiu o terceiro componente do sôro inactivado pelo calor pois conforme mostra (tubos de 10 a 21) o quadro esse sôro depois de contacto com o levedo reactiva o sôro fresco tratado pelo levedo no mesmo titulo que o sôro inactivado pelo calor que não esteve em contacto com a emulsão de levedos.

No entanto a mistura de sôro fresco com sôro a 56° tratada pelo levedo apresenta uma nitida diminuição da actividade alexica, diminuição que desaparece pela addição de sôro a 56° (tubos 6 a 9). No tubo 7 não houve traços de hemolyse embora nelle se contivessem 0,05 c.c. de sôro fresco mais 0,05 de sôro inactivado, isto é, 2 doses hemolysantes de alexina em fracções lábeis e 5 doses hemolysantes em 3° componente. E' fóra de duvida, portanto, que a emulsão de levedos foi capaz de retirar grande parte do 3° componente do sôro inactivado pelo calor que existia nessa mistura.

Tudo se passa como se para a inactivação da alexina pelas emulsões de levedo fosse indispensavel a presença de substancias termolabeis as quaes seriam causa directa da destruição do terceiro componente.

Não obstante a claresa d'estes resultados cumpre não esquecer que nas reacções de flocculação como a da toxina diphterica pela sua antitoxina, o tratamento prévio do sôro pelo calor, não só altera o titulo do optimo de flocculação mas retarda ás vezes consideravelmente o apparecimento e formação do precipitado especifico. Se se leva agora em consideração que a gelose produz no sôro fresco de cobaya um precipitado que possivelmente as emulsões de levedo tambem produzem, a conclusão apparentemente tão evidente exposta acima não póde ser aceita sem reservas. Todavia ainda em apoio della desejamos lembrar o facto bem estabelecido por Omorokow de que a simples diluição do sôro fresco em agua physiologica é sufficiente para prejudicar ou abolir a acção inactivante das emulsões de levedo, o que parece indicar a necessidade de uma concentração minima de substancias termo-labeis no sôro fresco para que se realise esse processo.

QUADRO V

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
Sôro fresco	0,02	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sôro fresco + levedo	—	0,4	0,3	0,2	0,05	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Sôro fresco + Sôro 56° + levedo	—	—	—	—	—	0,3	0,2	0,1	0,05	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sôro 56° + levedo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	0,05	0,02	0,01	0,005	0,002	0,001	—	—	—	—	—
Sôro 56°	—	—	—	—	0,05	—	—	—	0,05	—	—	—	—	—	—	—	0,02	0,01	0,005	0,002	0,001
Água physiologico	1,98	1,6	1,7	1,8	1,8	1,7	1,8	1,9	1,85	1,6	1,85	1,87	1,89	1,895	1,898	1,899	1,88	1,89	1,895	1,898	1,899
Glob. sensibilizados.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados	h. t.	traços	0	0	h. t.	h. t.	h. p.	0	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. p.	h. p.	h. p.	0	h. t.	h. p.	h. p.	h. p.	0

h. t. = Hemolyse total.

h. p. = Hemolyse parcial.

0 = Ausencia de hemolyse.

Do que ficou exposto, resulta que a complexidade do complemento é maior do que se tem até aqui acreditado e que pelo menos cinco elementos diferentes se podem nelle demonstrar.

*Ordem de successão da adsorção dos diferentes elementos da alexina na hemolyse especifica.*

Já vimos acima que a alexina não é um composto chimico formado pelas duas fracções termolabeis de Ferrata. A actividade alexica, como mostrou Brand, é o resultado da acção dessas duas substancias isoladamente, agindo uma depois da outra. Vimos que os globulos sensibilizados podem fixar a fracção globulina sem se hemolysarem e que para a sua hemolyse posterior, embora bem lavados com agua physiologica, basta adicionar-lhes a fracção albumina. Empregando um methodo semelhante, vimos tambem que Weil pode demonstrar a fixação sobre globulos sensibilizados não só da fracção globulina como o da fracção albumina, sem obter hemolyse, misturando-os com sôro fresco da cobaya de que havia retirado o terceiro componente. Depois de bem lavados esses globulos hemolysavam-se pela simples addição de sôro de cobaya inactivado pelo calôr. A esses globulos, vimos tambem que Nathan confirmando esses resultados denominou *hypersensibilizados*. Em resumo no estado actual da questão a actividade alexica é o resultado de uma serie de adhesões de tres substancias nesta ordem: *Globulos sensibilizados — Fracção globulina termolabil — Fracção Albumina termolabil — Componente termoresistente ou terceiro componente.*

Para confirmação destes resultados e verificação da ordem de adsorção dos elementos da alexina que ainda não foram estudados sob este ponto de vista procedemos do seguinte modo:

*Experiencia nº 1*—Sôro fresco de cobaya depois de distribuido em tubos foi tratado conforme a technica anteriormente descripta: pelo formol (Sôro formol), pelo hydrosulphito de sodio (Sôro  $S^2O^4Na^2$ ), pela ammonia (Sôro  $NH^3$ ) e pelo levedo (sôro levedo). Parte d'esse mesmo sôro foi inactivado pelo calor durante meia hora a  $56^\circ$  (Sôro  $56^\circ$ ).

A 5 c.c. da emulsão de globulos sensibilizados (obtida juntando a 2,5 c.c. da solução de globulos a 2,5 %, 2,5 c.c. de uma solução de sôro hemolytico contendo em cada 1 c.c. 40 U. H.) addicionou-se 1 c.c. de sôro a  $56^\circ$ . Após contacto a  $37^\circ$  em banho maria por espaço de uma hora os globulos assim tratados, foram centrifugados, 4 vezes lavados em agua physiologica e finalmente emulsionados em 5 c.c. de agua physiologica. Foram então distribuidos por 5 tubos de hemolyse na dóse de 1 c.c. em cada tubo.

Ao tubo nº. 1	adicionou-se	0,1 cc. de Sôro NH <sup>3</sup>
Ao « nº. 2	«	0,1 cc. de Sôro Levedo.
Ao « nº. 3	»	0,1 cc. de Sôro formol.
Ao « nº. 4	«	0,1 cc. de Sôro S <sup>2</sup> O <sup>4</sup> Na <sup>2</sup> .
Ao « nº. 5	«	0,1 cc. de Agua physiologica.

Ao fim de 1 hora em banho maria a 37° foram lidos os seguintes resultados: 1° tubo: hemolyse total <sup>1</sup>; 2°, 3°, 4° e 5° tubos ausencia completa de hemolyse. Verificou-se que qualquer dos sôros nas doses empregadas na experiencia não dava traços de hemolyse em presença de 1 c.c. de globulos sensibilizados que não tivessem permanecido em contacto com sôro inactivado pelo calor.

Resulta portanto d'esta experiencia que é o componente destruido pela ammonia que primeiro adhire aos globulos sensibilizados pois que o unico sôro capaz de produzir a hemolyse dos globulos sensibilizados postos em presença de sôro inactivado pelo calor é de facto o sôro em que foi destruido esse componente. Como se vê também tanto o componente destruido pelo formol como o que foi destruido pelo hydrosulphito não adhiem aos globulos sensibilizados como attesta a falta de hemolyse posterior pela addicção de qualquer delles. Que as conclusões que tirámos d'essa experiencia se justificam mostra a seguinte experiencia que é por assim dizer a reciproca da primeira:

*Experiencia nº. 2.*—A 5 c.c. de globulos previamente sensibilizados como como na experiencia anterior, foi adicionado 1 c.c. de sôro de cobaya tratado pela ammonia (Sôro NH<sup>3</sup>). Após uma hora de banho maria a 37°, os globulos foram lavados 4 vezes em agua physiologica, emulsionadas em 5 c.c. d'esse vehiculo e distribuidos em 5 tubos na dose de 1 c.c. em cada tubo.

Ao tubo nº. 1	adicionou-se	0,1 cc. de sôro 56°.
Ao « nº. 2	«	0,1 cc. de sôro levedo.
Ao » nº. 3	«	0,1 cc. de sôro formol.
Ao « nº. 4	»	0,1 cc. de sôro S <sup>2</sup> O <sup>4</sup> Na <sup>2</sup> .
Ao « nº. 5	«	0,1 cc. de agua physiologica.

Resultado: Após uma hora de banho maria a 37° nenhum dos tubos mostrou sequer traços de hemolyse.

<sup>1</sup> Repetindo muitas vezes esta experiencia observámos que nem sempre a hemolyse é total, porém sempre é perfeitamente perceptivel ao fim de 1 hora. Por outro lado nem sempre a inactivação pela ammonia permite obter sôros completamente inactivados e por isso, para garantia d'esses resultados fizemos muitas vezes esta mesma experiencia adicionando quantidades crescentes de sôro tratado pela ammonia a globulos sensibilizados e a globulos sensibilizados previamente postos em contacto com soro a 56° e bem lavados. Por comparação com a 1a. serie testemunha os resultados não deixam logar a duvidas.



D'aqui resulta pois que *sem a adesão prévia aos globulos sensibilizados da fracção sensível á ammonia, não se dá a adsorpção de nenhuma das outras fracções conhecidas mesmo as labeis e não resta pois nenhuma duvida que é essa fracção a que primeiro adhire aos globulos sensibilizados.*

*Experiencia nº. 3.*—A 5 c.c. de globulos sensibilizados como anteriormente adicionou-se 1 c.c. de sôro tratado pelo levedo e depois de permanencia em banho maria a 37° por espaço de uma hora os globulos foram centrifugados, quatro vezes lavados em agua physiologica e finalmente emulsionados em 5 c.c. d'esse mesmo vehiculo. Foram então distribuidos em 5 tubos na dóse de 1 c.c. cada um e a seguir.

Ao tubo nº. 1 adicionou-se 0,1 cc. de sôro amonia.

Ao « nº. 2 « 0,1 cc. de sôro 56.

Ao « nº. 3 « 0,1 cc. de sôro formol.

Ao « nº. 4 « 0,1 cc. de sôro  $S^2O^4Na^2$ .

Ao « nº. 5 « 0,1 cc. de agua physiologica.

Resultado: Ao fim de uma hora de banho maria a 37° verificou-se hemolyse total no primeiro tubo, hemolyse quasi total no 2° tubo, ausencia completa de hemolyse no terceiro, quarto e quinto tubos.

Esses resultados confirmam pois plenamente os obtidos por Weil e Nathan pois a presença de hemolyse no 2° tubo demonstra que na ausencia do terceiro componente tanto a fracção globulina como a fracção albumina de Ferrata ficaram ligadas aos globulos os quaes então se hemolysam pela simples addição de sôro inactivado pelo calôr.

Como, porém já anteriormente vimos que o terceiro componente não é um elemento simples mas pelo menos composto por sua vez de duas substancias uma destructivel pelo formol e outra destructivel pelo hydrosulphito de sodio procedemos á seguinte experiencia para ver qual d'essas substancias adhire primeiro aos globulos sensibilizados já carregados dos outros elementos da alexina.

*Experiencia nº. 4.*—A 5 c.c. de globulos sensibilizados como precedentemente, adicionou-se 1 c.c. de sôro tratado pelo hydrosulphito. Após meia hora de banho maria a 37° os globulos foram centrifugados, lavados 4 vezes em agua physiologica e emulsionados em 5 c.c. d'esse vehiculo. Finalmente foram distribuidos em 5 tubos na dóse de 1 c.c. por cada tubo e a seguir

Ao tubo nº. 1	adicionou-se	0,1 cc. de sôro NH <sup>3</sup> .
Ao « nº. 2	«	0,1 cc. de sôro 56.
Ao « nº. 3	«	0,1 cc. de sôro levedo.
Ao « nº. 4	«	0,1 cc. de sôro formol.
Ao « nº. 5	«	0,1 cc. de agua physiologica.

Resultado: No 1º tubo hemolyse total; no 2º tubo hemolyse parcial; no 3º tubo ausencia de hemolyse; no 4º tubo hemolyse total; no quinto tubo ausencia completa de hemolyse.

Parece pois que a fracção sensível ao formol adere aos globulos carregados da fracção sensível á ammonia e das fracções termolabeis de Ferrata, antes que se dê a adsorpção da fracção sensível ao hydrosulphito de sodio. Com effeito a seguinte experiencia que é a reciproca da precedente confirma de modo claro essa conclusão.

*Experiencia nº. 5*—A 5 c.c. de globulos sensibilizados como anteriormente foi adicionado 1 c.c. de sôro tratado pelo formol. Após meia hora na estufa a 37º esses globulos foram centrifugados, lavados 4 vezes e emulsionados em 5 c.c. de agua physiologica. A seguir foram distribuidos em 5 tubos na dóse de 1 c.c. em cada tubo.

Ao tubo nº. 1	adicionou-se	0,1 cc. de sôro NH <sup>3</sup> .
Ao « nº. 2	«	0,1 cc. de sôro 56.
Ao « nº. 3	«	0,1 cc. de sôro levedo.
Ao « nº. 4	«	0,1 cc. de sôro S <sup>2</sup> O <sup>4</sup> Na <sup>2</sup> .
Ao « nº. 5	«	0,1 cc. de agua physiologica.

Ao fim de mais uma hora a 37º em banho maria foram verificados estes resultados: no 1º tubo e no 2º hemolyse total. No terceiro, quarto e quinto tubos absoluta ausencia de hemolyse.

Fica pois claramente demonstrado com estas duas ultimas experiencias que a fracção sensível ao hydrosulphito é a ultima a adherir aos globulos e é essa adhesão que finalmente determina a hemolyse.

Procedendo á analyse das condições de permeabilidade osmotica da membrana dos globulos sensibilizados e carregados com todas as fracções da alexina menos a que é sensível ao hydrosulphito verificamos que collocados em soluções hypotonicas tomam ainda uma fórma globulosa e em soluções hypertonicas (chloreto de sodio a 10 %) tomam um aspecto engilhado caracteristico de boa permeabilidade a agua. Bem sabemos (Bordet) que tal não acontece depois da hemolyse completa.

Resumindo: Os diferentes elementos de que se compõe a alexina adherem aos globulos sensibilizados na seguinte ordem:

*Globulos sensibiliizados—Fracção sensivel á ammonia (termoresistente) — Fracção globulina (termolabil) — Fracção albumina (termolabil), — Fracção sensivel ao formol (termoresistente) e fracção sensivel ao hydrosulphito (termoresistente).*

Até ao momento de adherir esta ultima fracção a membrana

*Os Componentes da Alexina na Reacção de Bordet Wassermann —* Já mencionámos acima que segundo Skwirsky nas reacções de Bordet e Gengou, positivas tanto na reacção de Wassermann como em outras em que se encontram presentes antigeno e anticorpo é só a fracção globulina termolabil da alexina que se fixa sobre os complexos especificos enquanto a fracção albumina termolabil permanece livre e activa no liquido. Ora sendo ao tempo de Skwirsky, esses os unicos constituintes conhecidos e admittindo-se hoje com muita probabilidade que a reacção de Wassermann é na essencia uma reacção de precipitação, pareceu-nos conveniente verificar que parte tomam no phenomeno os constituintes termoresistentes, sobretudo o chamado terceiro componente pois que elle não só em geral acompanha nos processos de separação das fracções termolabeis a fracção globulina, como tambem se póde admittir adherem de uma fórma por assim dizer electiva a numerosas emulsões colloidaes.

E' bem sabido que a addição de 0,1 c.c. ou 0,2 c.c. de sôro de cobaya inactivado a 56° meia hora a uma mistura de sôro luetico e antigeno syphilitico, impede a fixação do complemento, transformando a reacção positiva em negativa. Se a addição de sôro inactivado pelo calôr é feita depois que o sôro luetico permaneceu em contacto a 37° por espaço de uma hora com o antigeno correspondente não se dá todavia a hemolyse pela addição de systema hemolytico, o que mostra que sendo capaz de impedir a fixação o sôro inactivado a 56° não é capaz de libertar o complemento fixado sobre o complexo especifico. Se ao invéz de inactivar o sôro a 56° o inactivamos a 54° durante meia hora, verifica-se então que elle é capaz não só de impedir a fixação mas é tambem capaz de libertal-o do complexo sobre o qual adheriu. E' o que claramente mostra o seguinte protocollo da experiencia:

*Sôro syphilitico—fortemente positivo inactivado a 56° 30 minutos.*

*Antigeno de Kolmer diluido a 1/20, dóse fixadora: 0,3 c.c.*

*Alexina de cobaya diluida a 1/10 dóses empregadas: 0,3 e 0,5 c.c. correspondendo no systema hemolytico empregado a 2 e 3 unidades complementares proximamente.*

*Systema hemolytico*: globulos de carneiro sensibilizados por 40 unidades hemolysantes de sôro de coelho anti-carneiro (1 c.c. da solução a 2,5 % mais 1 c.c. da diluição apropriada de sôro hemolytico).

QUADRO VI  
REACÇÃO

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8
Sôro syphilitico	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	—	—	—
Antigeno	0,3	0,3	0,3	0,3	—	0,6	—	—
Alexina	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,3	0,3	—
Sôro cobaya 56°	—	—	0,1	0,1	—	—	0,2	—
Agua physiologica	1,2	1,0	0,1	0,9	1,5	1,1	1,5	1,5
Globulos sensibilizados	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados	0	0	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	0

H. t. = Hemolyse total.

0 = Ausencia de hemolyse.

Os 5 primeiros elementos conforme o quadro permaneceram uma hora em banho maria a 37° antes de se lhes juntar o 6° constituido por globulos sensibilizados. A leitura da hemolyse foi feita com mais meia hora de estagio a 37°.

A acção impediante sobre a fixação exercida pelo sôro inactivado a 56° é bem patente.

No quadro VII tanto o sôro de cobaya inactivado a 56° e 54° como as fracções termolabeis da alexina foram adicionadas depois que a mistura de sôro syphilitico e antigeno tinha permanecido por espaço de uma hora a 37° em contacto com as doses empregadas de alexina.

Vê-se assim que o sôro a 56° é incapaz de libertar a alexina fixada na reacção ao passo que isso fazem não só o sôro inactivado a 54° como qualquer das fracções termolabeis da alexina. Convem todavia assignalar que a addição da fracção globulina produz mais rapidamente a hemolyse do que a addição da fracção albumina, mas o certo é que após a fixação do complemento na reacção de Wassermann fortemente positiva, parece permanecer livre no liquido não só a fracção globulina como a fracção albumina. No sôro aquecido a 54° meia hora, em geral existem tambem activas embora em pequena quantidade, as fracções termolabeis conforme se pôde vêr do quadro VIII:

QUADRO VII  
REACÇÃO

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sôro syphilitico.	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Antigeno	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
Alexina.	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5
Sôro cobaya 56°.	—	—	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—
Sôro cobaya 54°.	—	—	—	—	0,1	0,1	—	—	—	—
Fracção Globulina.	—	—	—	—	—	—	1 cc.	1 cc.	—	—
Fracção Albumina.	—	—	—	—	—	—	—	—	1 cc.	1 cc.
Agua physiologica.	1,2	1,0	1,1	0,9	1,1	0,9	0,2	—	0,2	—
Glob. sensibilizados	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados	0	0	0	0	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.

QUADRO VIII

TUBOS	1	2	3	4	5
Sôro cobaya 54°.	0,1	0,1	0,4	—	—
Fracção globulina.	1 cc.	—	—	2 cc.	—
Fracção albumina.	—	1 cc.	—	—	2 cc.
Agua physiologica.	0,9	0,9	1,6	—	—
Globulos sensibilizados.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados	h. t.	h. t.	0	0	0

Estes resultados parecem tornar plausivel a existencia de um componente destructivel pela temperatura de 56° mas diferente dos componentes termolabeis de Ferrata, e que a nosso ver lembram o constituinte assignalado por Bruinoghe na inactivação da alexina pela agua distillada.

Parece-nos todavia arriscado tirar qualquer conclusão d'estes resultados em 1° lugar porque contendo o sôro a 54° as fracções labeis de Ferrata só parcialmente inactivadas a sua addição a uma reacção positiva pôde dar em resultado uma simples somma de effeitos; em segundo lugar sendo o sôro a 56° capaz de impedir a fixação do complemento na reacção de Wassermann não é para desprezar a hypothese de que o sôro a 54° menos alterado pela temperatura tenha maior affinidade para o com-

plemento do que o complexo antígeno-sôro luetico e por isso seja capaz de o deslocar d'elle. Esta ultima hypothese, aliás, não é a que nos parece menos provavel.

#### *Origem da Alexina.*

Deve-se a Nolf o conhecimento da influencia que exerce o figado sobre o teôr em alexina do sôro sanguineo. Ella é de tal ordem que esse autor não hesitou em attribuir ao figado o papel de órgão gerador da alexina. Müller posteriormente poude mostrar que um choque operatorio mais grave que o da extirpação d'esse órgão como o que resulta da evacuação de todos os órgãos abdominaes com excepção do figado não tem a mesma acção sobre a alexina, mas que se conjunctamente se retira o figado pouco tempo depois o teôr da alexina baixa sensivelmente, demonstrando assim que não são os productos do intestino que passando directamente para a circulação se tornam os responsaveis pela quêda em complemento do sôro. Segundo Müller pôde-se mesmo demonstrar a formação da alexina em figados isolados do animal e mantidos vivos por meio de uma circulação artificial. Friedberger e Seelig trabalhando em rãs verificaram que o poder hemolytico d'esses animaes baixa fortemente depois da hepatectomia.

Dick, em 1911, em excellentes trabalhos demonstrou que em 11 cães de que se havia extirpado o pancreas embora apresentassem todos grande quantidade de assucar na urina e em 6 se tivesse demonstrado acidose intensa, tendo morrido entre alguns dias e duas semanas depois da intervenção, em nenhum observou diminuição da alexina do sôro. A retirada do pancreas e duodeno assim como tambem a retirada simultanea do pancreas e baço não produziram alteração do teôr em alexina. O mesmo acontece pela extirpação das capsulas supra-renaes, intestino delgado, estomago, thiroide ou rins. Em vista da difficuldade de executar a hepatectomia, Dick procurou eliminar a função hepatica por meio de venenos para o figado. Usou para isso quer o chloroformio quer o sulphato de hidrazina. Tanto com um como com o outro destes venenos observou constantemente nos animaes submettidos á experiencia, uma forte quêda na actividade alexica do sôro e concluiu d'ahi que ou a alexina é formada no figado ou da actividade do figado depende a sua presença no sangue. Na intoxicação experimental pelo phosphoro desde 1900 Ehrlich e Morgenroth, tinham observado em cobayas a desappareição completa do complemento.

Com excepção de Liefmann que não observou diminuição do poder hemolytico de rãs de que havia extirpado o figado todos os autores que abordaram este estudo estão de accôrdo com a forte influencia que exerce o figado na regulação da alexina do sôro. Abrindo outra excepção, Ro-

rosenthal, recentemente fazendo a extirpação do figado em cães pelo processo de Mann e Magath, chegou á conclusão de que o complemento não se forma n'esse órgão porque o teôr da alexina só baixa no sôro 11 horas após a extirpação d'essa viscera. Segundo o mesmo autor, coisa curiosa, o fibrinogenio tambem só baixa no sangue circulante justamente 11 horas após a retirada do figado. Como Rosenthal não se manifesta a respeito, é de crer que não considere possivel a origem hepatica do fibrinogenio, hoje em dia admittida por todos os autores que mais recentemente se occuparam com este estudo e que segundo Wöhlich se póde considerar como provado.

A questão mais difficil de resolver tanto nas relações do figado com alexina como nas suas relações com o fibrinogenio é saber se essa glandula é de facto o órgão de origem d'essas substancias, ou apenas o regulador da taxa d'ellas no sôro. No caso da alexina, sendo como vimos esse corpo um complexo de 5 elementos differentes pelo menos haveria primeiro que elucidar se alguns ou todos elles são ou não influenciados pelo figado. N'esse sentido fizemos algumas experiencias em cães a exemplo de Dick já com sulphato de hydrazina já com chloroformio. As experiencias com hydrazina tendo nos dado baixas menos accentuadas da alexina do que o envenenamento pelo chloroformio foi com este último corpo que executámos experiencias mais minuciosas pelas quaes se verifica que a intoxicação do figado produz uma baixa não só da alexina considerada globalmente, mas de cada um dos elementos em que actualmente póde ser desdobrada com excepção talvez da fracção globulina de Ferrata.

### QUADRO IX

#### *Dosagens da Alexina e dos seus Componentes*

	Antes da chloroformização		40 horas após a chloroformização	
Alexina	0,08 cc. h. t.	0,04 cc. 0	0,3 cc. h. t.	0,2 cc. 0
Alexina—0,1 sôro 56°	0,04 cc. h. t.	0,02 cc. 0	0,2 cc.	0
Alexina—0,1 sôro NH <sup>3</sup>	0,02 cc. h. t.	0,01 cc. 0	0,2 cc. h. t.	0,1 cc. 0
Alexina—0,1 sôro formol.	0,04 cc. h. t.	0,02 cc. 0	0,2 cc.	0
Alexina—0,1 soro S <sup>2</sup> O <sup>4</sup> Na <sup>2</sup>	0,002 cc. h. t.	0,001 cc. 0	0,04 cc. h. t.	0,01 cc. 0
Alexina—Fr. albumina.	0,04 cc. h. t.	0,02 cc. 0	0,06 cc. h. t.	0,04 cc. h. q. t.
Alexina—Fr. globulina.	0,02 cc. h. t.	0,01 cc. 0	0,15 h. t.	0,1 cc. h. q. t. 0,08 cc. 0

h. t. = Hemolyse total.

h. q. t. = Hemolyse quase total.

0 = Ausencia de hemolyse.

Eis o protocollo de uma das nossas experiencias procedidas em cães.

Cão pesando 12 kilos foi chloroformizado e mantido em narcose profunda profunda por espaço de 2 horas e 20 minutos, no que se gastaram cerca de 100

c.c. de chloroformio. Na tabella a seguir encontram-se as dosagens procedidas no sangue d'esse animal antes e 40 horas após a chloroformização. Nas dosagens a hemolyse foi sempre feita como anteriormente, isto é: solução de globulos de carneiro lavados a 2,5 % sensibilizados por 40 u. h. e a reacção executada no volume total de 4 c.c. de liquido.

Como claramente se vê todos os componentes da alexina soffreram sensivel redução. A alexina total apresentou um valor approximadamente 5 vezes menor que o do teôr primitivo. Tanto o componente sensivel á ammonia como o sensivel ao formol e ao hydrosulphito apresentaram um decrescimo ainda maior, cerca de dez a vinte vezes menos do que no sangue do animal são. A fracção albumina termolabil da alexina reduziu-se a cerca de 1/5 do valor primitivo e só a fracção globulina cahiu de modo insignificante dando hemolyse quasi total na dose em que antes da chloroformização dava hemolyse total: 0,04 c.c. Estes resultados mostram que a quéda do valor da alexina dosada globalmente é devida principalmente á falta dos componentes contidos na fracção albumina termolabil e confirmam tanto os resultados de Dick na intoxicação de cães com chloroformio, como os que um de nós (C. C.) encontrou na febre amarella, e pelos quaes esses autores foram levados a crer que o figado devia ser responsabilizado pela producção d'essa fracção. Todavia todas as outras fracções, com excepção talvez da fracção labil globulinica, se mostram dependentes da maior ou menor actividade hepatica.

A questão de saber se o figado é um simples regulador da alexina do sôre ou o seu orgão gerador parece-nos destituida de interesse, uma vez que a retirada de qualquer outro orgão que não seja o figado nenhuma accção exerce sobre o teôr da alexina do sangue. N'este sentido, aproveitando a oportunidade que se nos offereceu, tivemos occasião, graças ao obsequio do Dr. M. Osorio de Almeida, de acompanhar durante 4 a 5 horas o teôr alexico de tres cães submettidos á descerebração sem observar a mais leve diminuição da alexina embora em alguns a temperatura tivesse subido a 45° por exposição propositada aos raios solares.

Nos cães que submettemos á chloroformização observámos além d'isso que a quéda do teôr em alexina é visivelmente proporcional á quantidade de coagulo formado pela mesma quantidade de sangue extrahido. Ora as irregularidades que se observam na coagulação do sangue dos cães n'essas condições corre por conta sobretudo, se não exclusivamente, de uma baixa no teôr do fibrinogenio circulante (Whipple e Hurwitz). O parallelismo entre a quéda do fibrinogenio e a quéda do complemento nas intoxicações do figado resulta já dos resultados a que chegaram Whipple e Hurwitz quanto ao fibrinogenio e os de Dick quanto á alexina; os pri-



meiros concluem que essa diminuição é proporcional ao gráo de necrose do figado, conclusão a que tambem chega o segundo quanto á quéda do complemento. E' tão evidente esse parallelismo na intoxicação chloroformica que resolvemos instituir dosagens de fibrinogenio nos nossos animaes em experiencia no sangue da mesma sangria que nos fornecia material para dosagem da alexina. As dosagens de fibrinogenio foram executadas pelo methodo de Chandler graças á preciosa collaboração do nosso collega Dr. G. Villela com o qual viremos futuramente a publico mais pormenorizadamente sobre este assumpto. Damos a seguir o protocollo de um animal neste sentido examinado:

Cão pesando 8 kilos foi submettido á chloroformização e mantido em narcose profunda durante 2 horas e 10 minutos tendo-se gasto nesse espaço de tempo cerca de 90 c.c. de chloroformio.

#### QUADRO X

Dosagem fibrinogenio		Dosagem alexina
Antes da chloroformização	0,42 o/o	0,08 cc. h. t.
45 horas depois da chloroformização	0,15 o/o	entre 0,30 e 0,2 cc. h. t.
68 « « « «	0,17 o/o	0,22 cc. h. t.
90 « « « «	0,21 o/o	0,17 cc. h. t.
160 « « « «	0,41 o/o	0,085 cc. h. t.

A correspondencia de valores é de tal ordem que como é facil de verificar se as dosagens de complemento são feitas com sufficiente rigôr, se póde calcular por ellas o teôr em fibrinogenio n'esses animaes por uma simples proporção inversa.

A verdade é que se esse parallelismo tão estreito não é sufficiente para demonstrar que fibrinogenio e alexina são produzidos no mesmo orgão, não é menos verdade que todas as razões que prevalecem para levar a accôrdo a maioria dos autores no que diz respeito á origem hepatica do fibrinogenio são as mesmas bôas razões que militam pelo accôrdo ainda não completo sobre origem hepatica da alexina.

## SUMMARIO

1º. Os autores observam que após a inactivação de sôro de cobaya a 54º durante 30 minutos permanecem no sôro as fracções thermolabeis em quantidade apreciavel; um tal sôro conservado na temperatura de 6º, por espaço de 18 horas, regenera parte da sua actividade alexica perdida.

2º Confirma-se a existencia de 4 componentes do complemento.

3º O chamado terceiro componente de Ritz e Coca é na verdade constituídos por dois elementos, pelo menos, differentes: um destructivel pelo formol e outro destructivel pelo hydrosulphito de sodio.

4º A ammonia, o formol e o hydrosulphito de sodio são capazes de destruir os constituintes thermoresistentes da alexina do sôro inactivado a 56º 30 minutos, ao passo que as emulsões de levedos, de orgãos ou de geLOSE não o são.

5º As emulsões de levedo addicionadas a uma mistura em partes eguaes de sôro fresco de cobaya e de sôro aquecido a 56º, 30 m., são capazes de retirar não só o terceiro componente contido no sôro fresco da mistura, mas também o terceiro componente contido no sôro inactivado pelo calor.

6º Sem excluir a hypothese de uma flocculação em que o sôro aquecido exerça o papel de um colloide protector, os autores admittem que a inactivação do complemento pelas emulsões de levedo ou pela geLOSE seja devida a substancias thermolabeis, do sôro, depois de adsorpção por essas emulsões, de substancias anti-tripticas.

7º Os diversos elementos que constituem a alexina são adsorvidos pelos globulos sensibilizados na seguinte ordem: Globulos-sensibilizadora—Fracção thermo-resistente sensivel á ammonia—Fracção thermolabil Globulina—Fracção thermolabil albumina—Fracção thermoresistente sensivel ao formol—Fracção thermoresistente sensivel ao hydrosulphito de sodio.

8º Na reacção de Bordet-Wassermann fortemente positiva é fixada sobretudo a fracção globulina thermolabil do complemento e não sómente o terceiro componente como seria licito esperar; a fracção thermolabil albumina permanece de regra livre e activa no liquido.

9º Os autores acham que se deve considerar como demonstrada a origem hepatica da alexina. Segundo experiencias procedidas em cães intoxicados pelo chloroformio não só baixa consideravelmente o titulo alexico global do sôro mas também os titulos, de todos os constituintes da alexina separadamente, soffrem, com excepção da fracção thermolabil globulina, uma redução muito accentuada.

## BIBLIOGRAPHIA

- BORDET, J.—C. Rend. de la Soc. de Biol. 1913, vol. 74 pag. 225 e pag. 877.
- BORDET, J.—Traité de l'Immunité dans les maladies Infectieuses, 1920, pag. 610.
- BRAUN, H.—Bioch. Zeitschr. 1911, vol. 31 pag. 65.
- BROWNING e MACKIE—Zeitschr. f. Immunitätsf. Orig. 1914, vol. 21, pag. 422.
- BUCHNER, H.—Centralblatt f. Bakt. 1889, vol. 5. pag. 817.
- BUCHNER, H.—Centralblatt f. Bakt. 1889, vol. 6, pag. 1 e 561.
- BUCHNER, H.—Munch. Med. Wochenschr. 1891, 38 Jahrg. pag. 656.  
Internationaler Congress f. Hyg. und Demographie.  
Skt. f. Bakteriologie.
- COCA, ARTHUR F.—Zeitschr. f. Immunitätsf. Orig. 1914, vol. 21, pag. 604.
- DICK, GEORGE F.—The Journ. of Infectious Diseases, 1913 vol. 12, pag. 111.
- GORDON, J. WHITEHEAD, H. R. e WORMALL, A.—Biochemical Journ. 1926. vol. 20 pag. 1028.
- MICHAELIS, L. e SKWIRSK, P.—Zeitschr. f. Immunitätsf. 1910, vol. 4 pags. 357 e 629.
- NATHAN, ERNST—Zeitschr. f. Immunitätsf. Orig. 1914 vol. 21, pag. 259.
- NATHAN, E.—Zeitschr. f. Immunitätsf. 1917, vol. 26 pag. 503.
- NUTTALL, GEO.—Zeitschr. für Hyg. und Infektionskrankh. 1888, vol. 4, pag. 353.
- OMOROKOW, L.—Zeitschr. f. Immunitätsf. 1911, Orig. vol. 10, pag. 285.
- RITZ, H.—Zeitschr. f. Immunitätsf. Orig. 1911, vol. 9, pag. 321.
- RITZ, H.—Zeitschr. f. Immunitätsf. 1912 vol. 13 pag. 62.
- RITZ, H. e SACHS, H.—Centralblatt f. Bakt. Ref. 1911, vol. 50 pag. 43.
- RITZ, H. e SACHS, H.—Zeitschr. f. Immunitätsf. 1917, vol. 26 pag. 483.
- ROSENTHAL, F.—Ergebn. der Inn. Med. und Kinderheilk, 1928, vol. 33 pag. 139.
- SKWIRSKY, P.—Zeitschr. f. Immunitätsf. Orig. 1910 vol. 5, pag. 538.
- WHIPPLE, G. H. e HURWITZ, S. H.—The Journ. of Exp. Med. 1911, vol. 13 pag. 136.
- WHITEHEAD, H. R., GORDON, J. e WORMALL, A.—The Biochemical Journ. 1925, vol. 19, pag. 618.
- WÖHLISCH—Ergebn. der Phys. Jahrg. 28, 1929 pag. 582.